

SIRP α Effector Reporter Cell

CBP74122

操作说明书



4008-750-250

目录

1. 背景信息	2
2. 产品介绍	2
3. 细胞基本信息	3
4. 主要仪器试剂耗材	4
5. 细胞培养	4
5.1 细胞复苏	4
5.2 细胞传代	4
5.3 细胞冻存	5
6. 细胞实验流程	5
6.1 SIRP α /CD47 Blockade Assay	5
7. 数据展示	7
8. 相关产品	7

1. 背景信息

SIRP α 属于 SIRP 家族，是一个抑制性的免疫受体，它通常选择性的表达在髓系细胞（巨噬细胞，粒细胞和树突细胞等）以及神经细胞的膜表面，在其它体细胞上则较少有表达。作为一种跨膜蛋白，其胞外区存在三种免疫球蛋白结构域，其中 N 端氨基酸末端结构可与 CD47 结合介导细胞信号转导。

CD47 也称为抗原表面决定蛋白 OA3、整合素相关蛋白（IAP）和蛋白 MER6,为 5 次跨膜蛋白，属于免疫球蛋白超家族，其 N 端胞外区包含 1 个 Ig 样 V 型（免疫球蛋白样）结构域。CD47 广泛分布于各种组织中，通过与信号调节蛋白 α (Signal regulatory α , SIRP α), 血小板反应蛋白（thrombospondin-1, TSP1）以及整合素（Integrins）相互作用，影响细胞凋亡，增殖，免疫等一系列生理功能。

2. 产品介绍

科佰生物推出 SIRP α Effector Reporter Cell 报告基因细胞，在由因子调控并表达报告基因的重组细胞上，稳定表达人 SIRP α 。

报告基因细胞模型可以很好的反映分子作用机制，同时具备更小的变异性和更好的可操作性，已被中检院及药企广泛应用于抗体药物生物活性的检定，对于药物研发、质量控制、批次放行都有重要意义。

SIRP α /CD47 报告基因药靶模型很好的模拟了体内 SIRP α /CD47 的信号转导过程，原理见图 1 所示。

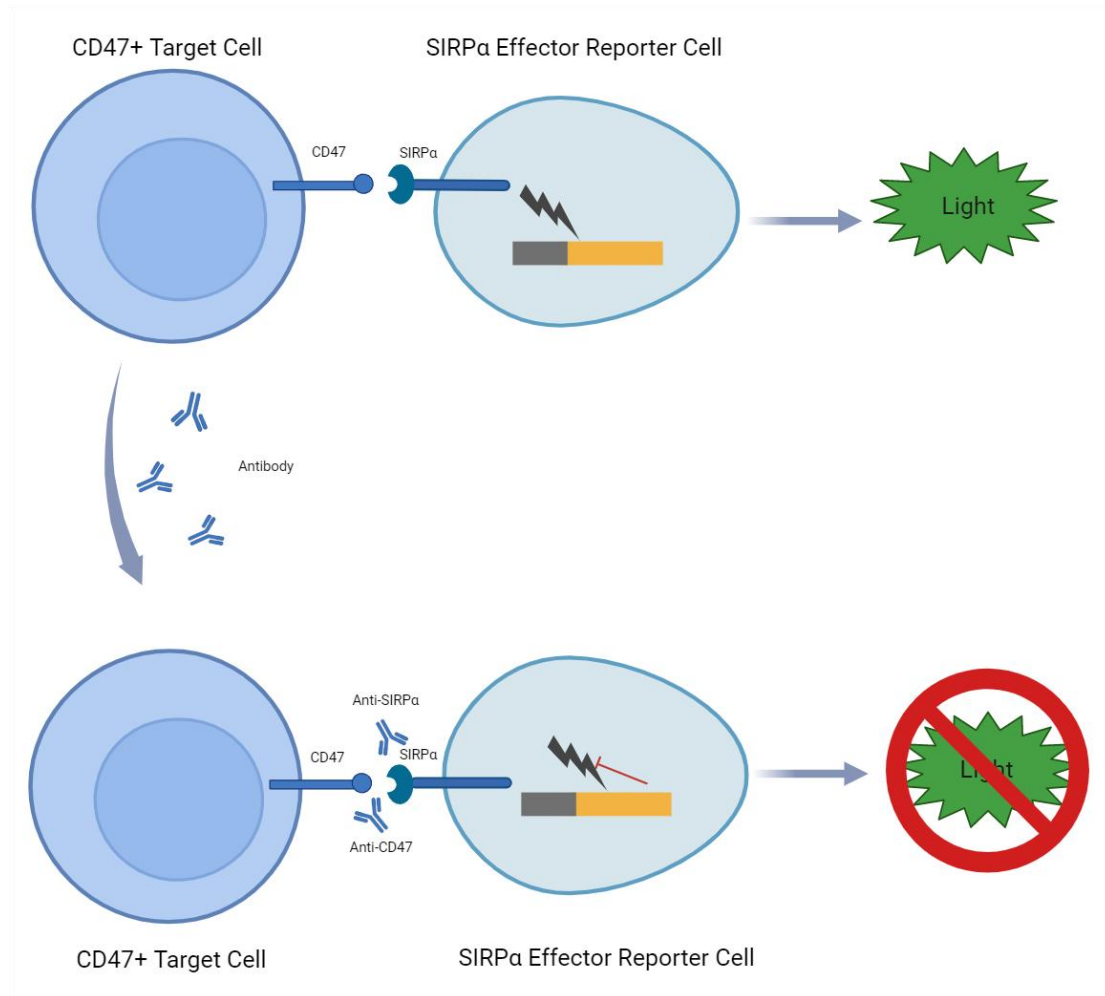


图 1: SIRP α /CD47 细胞模型原理图

3. 细胞基本信息

表达基因: SIRP α

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+1ug/ml puromycin+300ug/ml hygromycin

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态: 悬浮

支原体检测: 阴性

稳定性: 32 代 (室内测试结果, 不表示超过 32 代以上不稳定)

保存条件: 液氮保存

应用: 细胞水平 SIRP α 信号传导的激活剂或抑制剂的活性检测, 可用于高通量筛选或 QC 放行

4. 主要仪器试剂耗材

名称	品牌	货号
SIRP α Effector Reporter Cell 完全培养基	Cobioer	CBP74122M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
CD47+ Target Cell 细胞	Cobioer	CBP74124
Anti-SIRP α mAb	Cobioer	CBP74137A
Anti-CD47 mAb	Cobioer	CBP74124A
Ultra Luciferase Detection Kit	Cobioer	CBPH0001
96 Well Assay Plate (White Plate, Clear Bottom with Lid Tissue Culture Treated Polystyrene 1/Pack)	Costar	3610
Synergy H1 多功能酶标仪	Biotek	/

5. 细胞培养

5.1 细胞复苏

- 1) 在 37°C 水浴中快速融化细胞约 60 秒。一旦细胞解冻（可能比 60 秒稍快或稍慢），快速将冻存管中的细胞吸入装有 10 ml 预热 SIRP α Effector Reporter Cell 完全培养基的 15 ml 离心管中。
- 2) 1000 转、5 分钟离心细胞，除去培养基并将细胞重悬于 5 ml 预热的完全培养基中。
- 3) 调整细胞密度到 $3-6 \times 10^5$ cells/ml，加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中。

5.2 细胞传代

每 1-2 天取细胞悬液计数，当密度大于 1×10^6 cells/ml 时,请及时传代或补加新鲜完全培养基. 保持细胞密度在 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cells/ml 之间。

5.3 细胞冻存

取 $4-8 \times 10^6$ 细胞离心后弃上清。加 1ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入细胞冻存管。立即放入细胞冻存盒 (Nalgene 5100-0001)，加异丙醇到刻度线，放 -80°C 冰箱。24 小时后将冻存管转到液氮中长期保存。

6. 细胞实验流程

6.1 SIRP α /CD47 Blockade Assay

SIRP α /CD47 Blockade Assay 由报告细胞 SIRP α Effector Reporter Cell, Cat. #CBP74122 细胞和靶细胞 CD47+ Target Cell, Cat. #CBP74124 细胞配对开展，本实验中使用 Anti-SIRP α mAb, Cat.#CBP74122A 和 Anti-CD47 mAb, Cat.#CBP74124A 作为测试样本，对本模型的生物功能进行验证。



图 2: SIRP α /CD47 Blockade Assay 流程示意图

- 1) 取对数生长的 CD47+ Target Cell 细胞，胰酶消化重悬于新鲜的含 10%FBS 的 F12K 培养基中，将重悬的细胞密度调整为 2×10^6 cells/ml。
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中，40 ul/孔细胞悬液。
- 3) 用 10%血清 RPMI1640 培养基对测试样本进行梯度稀释，加入梯度稀释的 5*浓度样品 (20 ul/孔) 到接种好细胞的 96 孔板中，样本从最高浓度 50 ug/ml (5*浓度) 开始，3 倍稀释 10 个浓度梯度，并另外设置空白培养基对照孔 (注意：1) 样品浓度及梯度设置跟样品本身的特性及客户的实验需求高度相关，客户应根据自身的实际情况优化设置，我们不做具体推荐，本梯度稀释方案仅适用我们本次验证实验涉及样本;2) 对于 CD47 抗体，请加入样品后 37 度培养箱孵育 1 小时)。

- 4) 取对数期生长的 SIRP α Effector Reporter Cell 细胞离心弃上清, 重悬于新鲜的 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中将重悬的细胞密度调整为 1.5×10^6 cells/ml, 然后将细胞加入步骤 3 的 96 孔板中, 每孔 40 μ l, 放置 37°C 培养箱中继续培养 5 到 5.5 小时。
- 5) 将 Nano-Glo[®] Live Cell Assay System 中的 Nano-Glo[®] Live Cell Substrate 用 Nano-Glo[®] LCS Dilution Buffer 稀释 20 倍, 配制成 5*检测液。
- 6) 将步骤 4)的 96 孔板从培养箱中取出, 加入 25 μ l/孔 步骤 5)中配制的 5*检测液, 然后剧烈震荡 15 到 30 秒, 然后放置 10 到 20 分钟放入酶标仪中读取数值。
- 7) 根据每个梯度浓度孔对应的读值, 利用 Prism Graphpad 软件拟合样品对细胞激活的梯度曲线, 并且计算样品的 EC50。

孔板排布:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Assay Buffer
B	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	参考样本
C	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本1
D	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本2
E	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	参考样本
F	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本1
G	Buffer	no Antibody	稀释9	稀释8	稀释7	稀释6	稀释5	稀释4	稀释3	稀释2	稀释1	Buffer	测试样本2
H	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer	Assay Buffer

图 3: 96 孔板排布建议案例展示

7. 数据展示

Dose response of SIRP α Blocking Antibodies in SIRP α Effector Reporter Cells (C11) With CD47⁺ Target Cells

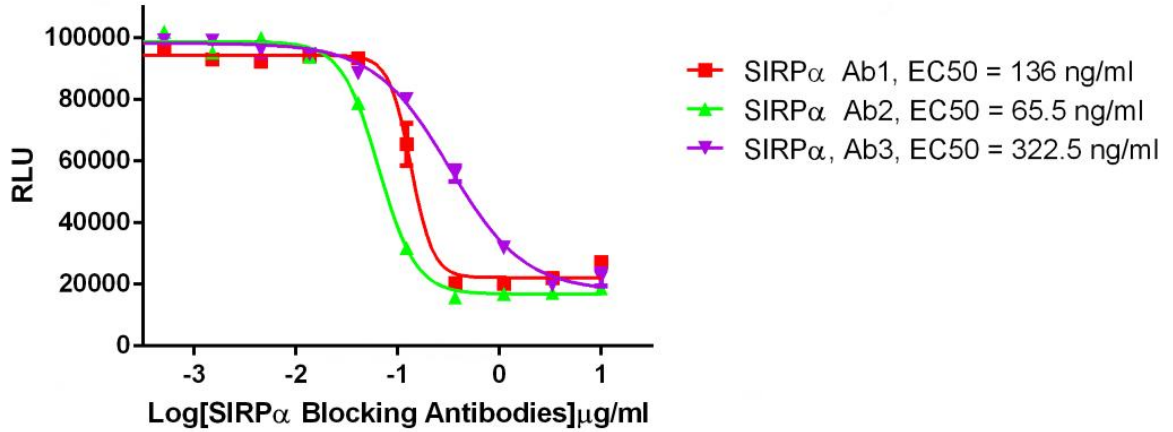


图 4: SIRP α /CD47 Blockade Assay 验证结果 (测试样本: Anti-SIRP α Ab)

Dose response of CD47 Blocking Antibody in SIRP α Effector Reporter Cells (C11) With CD47⁺ Target Cells

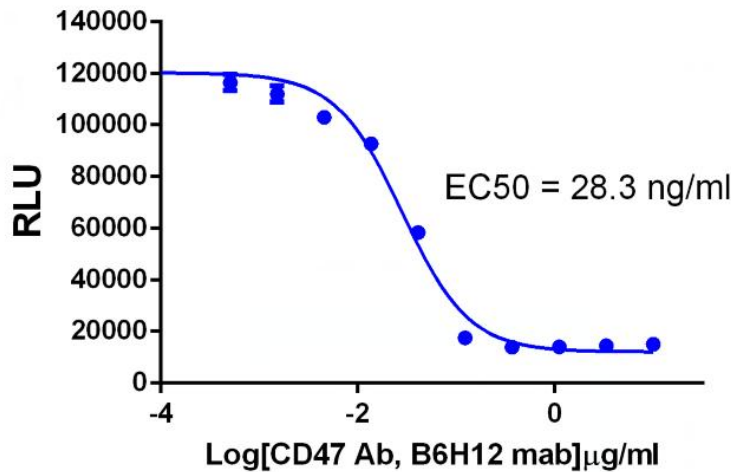


图 5: SIRP α /CD47 Blockade Assay 验证结果 (测试样本: Anti-CD47 Ab)

8. 相关产品

名称	货号
SIRP α /CD47 Dual Effector Reporter Cell	CBP74123

SIRP α Effector Reporter Cell	CBP74122
CD47+ Target Cell	CBP74124
SIRP α /PD-1 Dual Effector Reporter Cell	CBP74154
CD47/PD-L1 Dual Target Cell	CBP74155